

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(31) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> A61K 39/09, 39/145, 39/155, A61P 37/04, 31/12	(11) Numéro de publication internationale WO 00/15256
(32) Date de dépôt internationale 13 septembre 1999 (13.09.99)	(43) Date de publication internationale 29 mars 2000 (29.03.00)
(33) Numéro de la demande internationale PCT/FR99/02177	(51) États désignés AR, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, et tous les États membres de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) désignés par le préfixe "A".
(34) Demandes relatives à la priorité 90/11520 (11 septembre 1998 (11.09.98)) FR	(52) États désignés en vertu de l'article 17 de la Convention de 1978 AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, et tous les États membres de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) désignés par le préfixe "A".
(71) Demandeur (pour tous les États désignés sauf l'US) PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS (SA/PR) SA, avenue Leduc, P-69007 Lyon (FR).	(72) Inventeur(s) HAENSLER, Jean (FR/FR); 17, rue I. Piccardet, P-69700 Saint Genis les Oullières (FR).
(73) Investisseur/déposant (US seulement) PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS (SA/PR) SA, avenue Leduc, P-69007 Lyon (FR).	(74) Mandataire KERNER, Denise; Pasteur Merieux Sérum et Vaccins, Département des Entreprises Industrielles, 35, avenue Leduc, P-69007 Lyon (FR).

(54) Titre: EMULSION IMMUNOSTIMULANTE

(57) Abrégé

The invention concerns an oil-in-water immunostimulant emulsion comprising an aqueous phase and an oil phase, characterized in that it further comprises an immunostimulant polymerizable when used as an emulsion bound to at least a lipid molecule. The invention also concerns a vaccine composition comprising such an emulsion as immunoadjuvant.

La présente invention concerne une émulsion immunostimulante de type huile dans eau, qui comprend une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un polymérisable immunostimulant lié au moins à une partie d'un composé lipidique. L'invention concerne également une composition vaccinale comprenant une telle émulsion.

UNIQUEMENT À TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les États parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiées des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	AF	Algérie	AG	Argentine
AM	Arménie	AN	Andorre	AO	Angola
AR	Argentine	AT	Autriche	AS	Australie
AU	Australie	AX	Åland	BA	Bosnie-Herzégovine
AX	Åland	BB	Barbade	BD	Bangladesh
BA	Bosnie-Herzégovine	BE	Belgique	BF	Burkina Faso
BB	Barbade	BG	Bulgarie	BI	Burundi
BD	Bangladesh	BM	Bermudes	BJ	Bénin
BE	Belgique	BN	Brunei	BK	Bhoutan
BF	Burkina Faso	BO	Bolivie	BR	Brazile
BJ	Bénin	BS	Bahamas	BT	Bhoutan
BK	Bhoutan	BV	Bouvet	CA	Canada
BR	Brazile	CC	Cocos	CE	Côte d'Ivoire
BS	Bahamas	CD	Congo	CF	Cameroun
BT	Bhoutan	CG	Congo	CH	Suisse
BV	Bouvet	CI	Côte d'Ivoire	CK	Îles Cook
CA	Canada	CL	Chili	CM	Cameroun
CC	Cocos	CM	Cameroun	CN	Chine
CD	Congo	CO	Colombie	CU	Cuba
CE	Cameroun	CR	Costa Rica	DE	Allemagne
CF	Cameroun	CS	Serbie	DK	Danemark
CH	Suisse	CU	Cuba	DM	Antilles néerlandaises
CK	Îles Cook	DE	Allemagne	DO	République dominicaine
CL	Chili	DM	Antilles néerlandaises	DZ	Algérie
CM	Cameroun	DO	République dominicaine	EC	Ecosse
CN	Chine	DZ	Algérie	EE	Estonie
CO	Colombie	EE	Estonie	EG	Égypte
CR	Costa Rica	EG	Égypte	EH	Saoudiennes
CS	Serbie	EH	Saoudiennes	ES	Espagne
CU	Cuba	ES	Espagne	ET	Éthiopie
DE	Allemagne	ET	Éthiopie	FI	Finlande
DK	Danemark	FI	Finlande	FR	France
DM	Antilles néerlandaises	FR	France	GB	Royaume-Uni
DO	République dominicaine	GB	Royaume-Uni	GD	Géorgie
DZ	Algérie	GD	Géorgie	GE	Géorgie
EC	Ecosse	GE	Géorgie	GF	Guayana française
EE	Estonie	GF	Guayana française	GG	Guernesey
EG	Égypte	GG	Guernesey	GH	Ghana
EH	Saoudiennes	GH	Ghana	GI	Gibraltar
ES	Espagne	GI	Gibraltar	GL	Groenland
ET	Éthiopie	GL	Groenland	GM	Gambie
FI	Finlande	GM	Gambie	GN	Guinée
FR	France	GN	Guinée	GR	Grèce
GB	Royaume-Uni	GR	Grèce	GU	Guam
GD	Géorgie	GU	Guam	GW	Guinée-Bissau
GE	Géorgie	GW	Guinée-Bissau	GY	Guyane
GF	Guayana française	GY	Guyane	HA	Haïti
GG	Guernesey	HA	Haïti	HN	Honduras
GH	Ghana	HN	Honduras	HR	Croatie
GI	Gibraltar	HR	Croatie	HT	Haïti
GL	Groenland	HT	Haïti	HU	Hongrie
GM	Gambie	HU	Hongrie	IE	Irlande
GN	Guinée	IE	Irlande	IL	Israël
GR	Grèce	IL	Israël	IM	Îles Man
GU	Guam	IM	Îles Man	IN	Inde
GW	Guinée-Bissau	IN	Inde	IO	Indes occidentales
GY	Guyane	IO	Indes occidentales	IS	Islande
HA	Haïti	IS	Islande	IT	Italie
HN	Honduras	IT	Italie	JE	Jersey
HR	Croatie	JE	Jersey	JM	Jamaïque
HT	Haïti	JM	Jamaïque	JO	Jordanie
HU	Hongrie	JO	Jordanie	JP	Japon
IE	Irlande	JP	Japon	KE	Kenya
IL	Israël	KE	Kenya	KG	Kirghizistan
IM	Îles Man	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
IN	Inde	KH	Kambodge	KI	Kiribati
IO	Indes occidentales	KI	Kiribati	KM	Comores
IS	Islande	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
IT	Italie	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
JE	Jersey	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
JM	Jamaïque	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
JO	Jordanie	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
JP	Japon	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KE	Kenya	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud
KN	Saint-Kitts et Nevis	KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord
KO	Corée du Sud	KR	Corée du Nord	KU	Koweït
KR	Corée du Nord	KU	Koweït	KV	Kazakhstan
KU	Koweït	KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan
KV	Kazakhstan	KG	Kirghizistan	KH	Kambodge
KG	Kirghizistan	KH	Kambodge	KI	Kiribati
KH	Kambodge	KI	Kiribati	KM	Comores
KI	Kiribati	KM	Comores	KN	Saint-Kitts et Nevis
K					

WO 00/15256

PCT/FR90/02177

## EMULSION IMMUNOSTIMULANTE

L'invention concerne le domaine des vaccins et plus particulièrement les adjuvants de vaccins.

Les vaccins, qu'ils soient prophylactiques ou thérapeutiques, sont destinés à stimuler le système immunitaire de l'organisme humain ou animal auquel ils sont administrés, la réponse du système immunitaire pouvant être soit une réponse de type humorale (production d'anticorps), soit une réponse de type cellulaire, soit encore une combinaison des 2 types de réponses. De façon classique, depuis de nombreuses années, la vaccination a consisté à administrer à un organisme une version non pathogène d'un micro-organisme de façon à préparer le système immunitaire à réagir efficacement dans le cas où l'organisme serait amené ultérieurement à rencontrer le même micro-organisme, dans sa version pathogène. L'antigène administré lors de la vaccination peut être de différentes natures : micro-organisme tué entier ou fragmenté, souche vivante atténuée du micro-organisme, fractions antigéniques du micro-organisme ou encore polynucéotides susceptibles de conduire à l'expression par l'organisme d'une fraction antigénique.

Depuis déjà longtemps, on a cherché à augmenter la réponse du système immunitaire ou à modifier sa nature, non pas simplement en agissant sur l'antigène administré ou sur son mode d'administration, mais également en lui adjoignant des substances immunostimulantes ou adjuvants. Depuis l'adjuvant complet de Freund, de nombreux produits ont été testés, notamment des sels minéraux (tels que le chlorure de zinc, le phosphate de calcium, l'hydroxyde d'aluminium ou encore le phosphate d'aluminium par exemple), des asponines, des polymères, des lipides ou des fractions lipidiques (Lipide A, Monophosphoryl Lipid A),...etc. Cependant, peu d'entre eux présentent toutes les caractéristiques souhaitées : être de bons immuno-adjuvants, stables, mais sans risque de toxicité.

On connaît d'autre part, par la demande WO 96/02555, des oligonucéotides pouvant avoir une activité immunostimulatrice, ces oligonucéotides pouvant être administrés comme adjuvant vaccinal. Cette

WO 00/15256

PCT/FR90/02177

- 2 -

référence mentionne également la possibilité d'associer à ces oligonucéotides par liaison ionique, covalente ou par encapsulation, des moyens pour cibler l'administration de l'oligonucéotide. De tels moyens peuvent être notamment constitués de stérol, de lipide (par exemple un lipide cationique, un virusome ou un liposome) ou un agent de liaison spécifique à la cellule-cible (par exemple un liant reconnu par un récepteur spécifique de la cellule-cible). Cette demande mentionne encore, parmi toutes les variantes d'utilisation des polynucéotides décrits, la possibilité de les administrer en conjonction avec un véhicule porteur pharmaceutiquement acceptable. Cette demande n'identifie pas de véhicule comme étant d'un intérêt particulier mais en donne une liste indicative et cite à cet égard notamment les solutions, les solvants, les milieux de dispersion, les agents-retard, les émulsions et autres; l'utilisation de tels milieux pour des substances pharmaceutiquement actives étant mentionnée comme étant bien connue dans ce domaine.

Selon l'enseignement de ce document, la quantité d'oligonucéotides administrés doit être en quantité suffisante pour réaliser l'effet biologique recherché.

Or, les auteurs de la présente invention ont trouvé que, de façon tout à fait inattendue, il était possible d'accroître fortement l'effet immuno-adjuvant d'un oligonucéotide, sans être obligé d'accroître la quantité d'oligonucéotides ou la quantité d'antigènes administrés.

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet une émulsion immunostimulante du type huile dans eau, comprenant au moins une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un polynucéotide immunostimulant dont au moins une partie est couplée de façon covalente à au moins une molécule lipidique.

Aux fins de l'invention, on entend par émulsion de type huile dans eau, une dispersion de gouttelettes d'huile dans une phase aqueuse pouvant être constituée par du tampon tel que le tampon PBS. La phase huileuse est constituée par une huile pharmaceutiquement acceptable, qui peut être une huile minérale, animale ou végétale. De préférence, on utilise une huile métabolisable telle que le squalène, les esters (notamment l'oléate d'éthyle, le

myristate d'isopropyle), une huile végétale[ par exemple l'huile de ricin, l'huile de tournesol, l'huile d'olive...], ou encore une huile végétale modifiée (ex : les macrogol glycérides). On peut, notamment, obtenir une émulsion satisfaisante en mélangeant 500 mg de squalène à 10 ml de tampon PBS dans un appareil tel qu'un ULTRA-TURRAX™, puis en microfluidisant la dispersion obtenue grâce à un microfluidiseur tel que le Microfluidics™, ce qui permet d'obtenir des particules huileuses dont le diamètre est inférieur à 200 nm.

Afin de faciliter la formation de l'émulsion, il est possible d'utiliser en outre un agent tensio-actif, notamment un agent tensio-actif dont la valeur HLB (Balance Hydrophile/Lipophile) est comprise entre 6 et 14. Il est notamment possible d'utiliser un agent tensio-actif choisi parmi la liste des produits suivants : les esters de sorbitan et les polysorbates, l'huile de ricin éthoxylée hydrogénée ou non, l'acide stéarique éthoxylé, l'alcool oléique 10 OE, l'alcool cétoalcoyle 20 OE, le stéarate de glycérine, le stéarate de sodium, le cocoate de laécithines, le lauryl sulfate de sodium, le stéarate de sodium, le cocoate de glycérol éthoxylé, 70E, les esters de glycérol éthoxylés, les acides oléiques éthoxylés, l'oléate de mannitol. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant du TWEEN™ 80.

L'émulsion obtenue est considérée immunostimulante si elle est capable de provoquer ou d'accroître la stimulation du système immunitaire, par exemple lors de son administration conjointement à un antigène vaccinal. Dans cette application, l'émulsion est utilisée comme immuno-adjuvant.

Cette activité immuno-adjuvante peut s'exprimer de différentes façons :

- rendre viable la réponse du système immunitaire à l'administration conjointe de l'antigène et de l'émulsion, alors que la réponse à l'administration de l'antigène seul ne l'était pas,

- accroître le degré de la réponse du système immunitaire sans en modifier la nature (par exemple : augmenter la quantité d'anticorps produits),

- modifier la nature de la réponse du système immunitaire à l'administration de l'antigène (par exemple, induire une réponse cellulaire alors que l'administration de l'antigène seul provoquait uniquement une réponse humorale),

- Induire ou accroître la production de cytokines, ou de certaines cytokines en particulier.

Par "polynucléotide" au sens de la présente invention, on comprend un oligonucléotide simple brin ayant de 6 à 100 nucléotides, de préférence de 6 à 30 nucléotides. Il peut s'agir d'oligoribonucléotide, ou d'oligodesoxyribonucléotide. On utilise de préférence des polynucléotides comprenant des séquences de base à symétrie inversée, tel que cela est le cas dans les séquences palindromiques (c'est-à-dire des séquences de type ABCDEED'C'B'A' où A et A', B et B', C et C', D et D' E et E' sont des bases complémentaires au sens de Watson et Crick), et plus particulièrement des polynucléotides comprenant au moins une séquence dinucléotidique Cytosine, Guanine, dans laquelle la Cytosine et la Guanine ne sont pas méthylées. Tout autre polynucléotide connu pour être, par sa nature même, immunostimulant, peut convenir aux fins de l'invention. Ainsi, il est possible également d'utiliser les oligonucléotides immunostimulants décrits dans la demande de brevet WO98/02555. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un polynucléotide dont la séquence des bases est la suivante :

GAGAACGCTCGACCTTCGAT.

Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester, ou afin d'être plus stables sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester/phosphorothioates. Bien qu'il soit possible d'utiliser des oligonucléotides provenant de sources d'acides nucléiques existantes tel que l'ADN génomique ou le cADN, on préfère utiliser des oligonucléotides de synthèse. Ainsi, il est possible d'élaborer des oligonucléotides sur support solide en utilisant la méthode  $\beta$ -cyano éthyl phosphoramidite (Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862 (1981)) pour l'assemblage 3'-5', puis on procède à une précipitation en éthanol en présence d'acétate de sodium 0,3 M non ajusté en pH (0,3M en final). On effectue ensuite une précipitation par 4 volumes d'éthanol à 80% suivi d'un séchage avant de procéder à une reprise par de l'eau pure.

Les oligonucleotides phosphorothioates ont un des atomes d'Oxygène composant le groupement Phosphate qui est remplacé par un atome de Soufre. Leur synthèse peut être effectuée comme précédemment décrit, sauf à remplacer la solution Iodeau/pyridine tétrahydrofurane qui est utilisée lors de l'étape d'oxydation nécessaire à la synthèse des liaisons phosphorothioate par une solution TETD (tétrathylthiuram disulfide) apportant les ions sulfates permettant de produire le groupement phosphorothioate.

On peut également envisager d'autres modifications des liaisons phosphorothioates, des bases ou des sucres, pour modifier les propriétés des oligonucleotides utilisés, et notamment pour accroître leur stabilité.

Selon l'invention, on couple au polynucleotide au moins une molécule lipidique de façon covalente. Cette molécule lipidique est de préférence une molécule de cholestérol ou de dérivé de cholestérol. Le couplage peut être effectué par liaison covalente à une ou à chaque extrémité du polynucleotide, ou encore par insertion à côté de chaque base d'au moins une molécule lipidique. Ce couplage peut être effectué directement lors de la synthèse du polynucleotide en utilisant dans le synthétiseur d'oligonucleotides un réactif de type Cholestérol Phosphoramidite au lieu du réactif Phosphoramidite habituellement utilisé.

Les antigènes dont il est possible de potentialiser l'effet grâce à l'émulsion selon la présente invention, peuvent être de nature variée : il peut notamment s'agir de protéines, de glycoprotéines, de glycolipides, de polysaccharides ou encore de polynucleotides comprenant des fractions d'ADN susceptibles de conduire à l'expression de molécules d'intérêt : il peut également s'agir d'un mélange de différents antigènes. De particulièrement bons résultats ont été obtenus avec une composition comprenant des antigènes de la grippe tels qu'ils sont présents dans le vaccin commercial VAXIGRIP®.

On peut obtenir une émulsion selon l'invention en procédant de la façon suivante : on mélange tout d'abord, sous agitation, l'huile avec la phase aqueuse constituée éventuellement par une solution tampon dans laquelle a été incorporé un surfactant. Le mélange obtenu est homogénéisé au moyen, par exemple, d'un agitateur à hélice, afin de conduire à une émulsion du type

huile dans eau. De préférence, on traite ensuite l'émulsion obtenue au moyen d'un microfluidisateur afin de réduire les gouttelettes d'huile à un diamètre inférieur à 200 nm.

Puis, cette émulsion étant maintenue sous agitation, on lui ajoute simplement le polynucleotide auquel a été couplé le lipide, et on obtient l'émulsion objet de la présente invention.

Lorsque cette émulsion est destinée à être utilisée comme immunoadjuvant, on la mélange sous agitation, à une composition comprenant l'antigène dont on souhaite potentialiser l'effet. Le mélange peut être éventuellement effectué dans un rapport volumique de 1. On peut, ensuite, vérifier l'effet attendu et notamment l'effet synergique obtenu sur la stimulation du système immunitaire par l'utilisation simultanée d'un polynucleotide couplé à au moins une molécule de lipide, et son incorporation à une émulsion de type huile dans eau.

A cette fin, il est possible de réaliser un test d'immunogénicité sur des souris divisées en plusieurs groupes, à qui on administre, suivant le groupe :

- soit une composition comprenant uniquement l'antigène ou le mélange d'antigènes vis-à-vis desquels on veut tester l'effet immunostimulant de l'émulsion selon l'invention,

- soit une composition, comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une solution comprenant uniquement des polynucleotides couplés à au moins une molécule de lipides,

- soit une composition comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une émulsion de type huile dans eau, sans polynucleotide, ou avec un polynucleotide dépourvu d'activité immunostimulante vis-à-vis des antigènes administrés,

- soit une composition comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une émulsion selon l'invention.

Pour chacune des souris immunisées, on peut, ensuite, déterminer la quantité et la nature des anticorps produits ce qui permet de déterminer la GMT (ou Moyenne Géométrique du Titre en Anticorps) : on peut également effectuer des dosages des cytokines produites ; en outre, on peut effectuer des

dosages permettant de déterminer la réponse cellulaire du système immunitaire.

Les résultats obtenus ont montré un effet synergique important des éléments constituant l'émulsion selon l'invention.

5 De plus, l'émulsion obtenue selon l'invention présente une stabilité accrue par rapport aux émulsions de même nature, i.e. celles constituées d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse identiques, mais dépourvues de polynucéotides.

Les exemples qui suivent illustrent de façon plus précise un mode de réalisation de l'invention.

#### Exemple 1

On prépare des oligonucéotides grâce à un automate synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une étape d'oxydation.

Cette étape d'oxydation est réalisée au moyen d'une solution iodée/eau/tétrahydrofurane/acétonitrile pour obtenir une liaison phosphodiester et au moyen d'une solution tétraéthylthiuram/acétonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate. On prépare ainsi un oligonucéotide 3 Db(S) dont la séquence est reproduite sous SEQ ID NO 1 et qui comporte des liaisons phosphorothioate sur toute sa longueur.

On prépare également un oligonucéotide MGC (S) dont la séquence est reproduite à SEQ ID NO 2, qui comporte à la fois des liaisons phosphodiester et des liaisons phosphorothioate. Les liaisons phosphorothioate sont situées à chaque extrémité ; il y a 2 liaisons phosphorothioate en 3' et 5 liaisons phosphorothioate en 5'. Cet oligonucéotide ne possède pas de séquence palindromique, et notamment pas de séquence CG.

#### Exemple 2

On prépare des oligonucéotides auxquels sont couplés aux extrémités des molécules de cholestérol. La synthèse de ces oligonucéotides 3 Db(S)-chol et

MGC(S)-chol est effectuée de la même manière qu'à l'exemple 1, à l'exception du réactif Phosphoramidite qui est remplacé par un réactif spécifique, le Cholestérol-ON™ Phosphoramidite fourni par la société CLONTECH Lab. Inc. (USA), lors du premier et du dernier cycle de synthèse afin d'obtenir une molécule de cholestérol insérée avant chacun des nucléotides d'extrémité.

Les séquences de nucléotides obtenues sont identiques à celles des oligonucéotides décrits à l'exemple précédent.

#### Exemple 3

On dispose de 10 ml de tampon PBS auxquels on ajoute 25 mg de Tween™80 et 500 mg de squalène. Le mélange obtenu est émulsionné grâce à un appareil ULTRA-TURRAX™ T25 pendant 1 min à 13500 tours/min.

L'émulsion obtenue est ensuite fluidisée grâce à un traitement de 5 cycles à 500 Psi dans un microfluidiseur Microfluidics™.

#### Exemple 4

Préparation d'une émulsion squalène/PBS comprenant des polynucéotides couplés à du cholestérol.

On prépare une émulsion immunostimulante selon l'invention en mélangeant 435 µl de la solution à 2,3 g/l de 3Db(S) couplé au cholestérol obtenue à l'exemple 2 (soit 1 mg d'oligonucéotide), avec 2 ml de l'émulsion squalène/PBS obtenue à l'exemple 3, maintenue sous agitation.

On prépare une autre émulsion en mélangeant 283 µl de la solution à 3,81 g/l de MGC(S) couplé à du cholestérol obtenue à l'exemple 2 (soit 1 mg d'oligonucéotide) avec 2 ml de l'émulsion squalène/PBS obtenue à l'exemple 3, maintenue sous agitation.

- 9 -

**Exemple 5****Préparation des compositions d'immunisation.**

On prépare des doses d'immunisation de différentes natures en ajoutant sous agitation 2 ml de vaccin splité contre la grippe NIB18 (monovalent A/Singapore H1N1) contenant 100 µg d'hémagglutinine HA en tampon PBS à 2 ml de chacune des préparations suivantes :

- tampon PBS
- solution MGC(S) obtenue à l'exemple 1,
- solution MGC(S)-chol obtenue à l'exemple 2,
- émulsion MGC(S)-chol obtenue à l'exemple 4,
- solution 3Db(S) obtenue à l'exemple 1,
- solution 3Db(S)-chol obtenue à l'exemple 2,
- émulsion 3Db(S)-chol obtenue à l'exemple 4.

**Exemple 6****Immunisation.**

- 20 On dispose de groupes de 6 souris Balb/c femelles âgées de 6 à 8 semaines, chaque groupe correspondant à une des préparations effectuées à l'exemple 6. Chacune des souris est immunisée avec 200µl de la préparation correspondant à son groupe et reçoit donc 5µg de HA par immunisation, chaque souris étant immunisée 2 fois à 3 semaines d'intervalle, avec la même préparation.
- 25 2 semaines après la deuxième injection, on mesure la réponse en anticorps spécifiques anti-HA, grâce à un test ELISA, et on détermine la GMT pour les IgG1 ainsi que pour les IgG2a.

- 10 -

Les résultats obtenus sont indiqués ci-après :

	GMT/IgG1	GMT/IgG2a
HA uniquement	38 062	2 137
HAMGC(S)	37 618	1 050
5 HAMGC(S)-chol	28 039	1 498
HAMGC(S)-chol/émulsion	264 776	26 981
HA3Db(S)	63 939	43 529
HA3Db(S)-chol	65 904	31 096
10 HA3Db(S)-chol/émulsion	611 301	218 142

Les résultats obtenus confirment que l'oligonucléotide 3Db(S) est bien doté de propriétés immunostimulantes car il est capable d'induire un accroissement de la réponse en anticorps par rapport à ce qui est obtenu lors de l'administration des antigènes seuls. Par contre, les résultats obtenus avec l'oligonucléotide MGC(S) ne démontrent pas d'activité immunostimulante.

D'autre part, on remarque que, de façon inattendue, l'émulsion contenant un polynucéotide immunostimulant tel que le polynucéotide 3Db(S) conduit à une production d'anticorps nettement supérieure à celle obtenue avec une émulsion contenant le polynucéotide MGC(S)-chol; cet effet est encore plus remarquable en ce qui concerne la production d'IgG2a: ce qui est indicateur d'une orientation de la réponse immunitaire vers un type TH1, orientation parfois soustraite dans certaines cibles vaccinales.

25 En effet, en considérant que l'effet attendu d'une émulsion est l'effet obtenu avec l'émulsion HAMGC(S)-chol, (l'oligonucléotide MGC(S) n'ayant par lui-même aucun effet immunostimulant vis-à-vis des antigènes administrés ainsi que cela est analysé ci-dessus), on note un effet synergique important de l'émulsion selon l'invention car le titre obtenu pour la production d'anticorps, que ce soit pour les IgG1 ou de façon plus nette encore pour les IgG2a, est nettement supérieur à la somme des titres obtenus séparément pour chacune des 2 compositions (émulsion HAMGC(S) d'une part et solution HA3Db(S) d'autre part)

Exemple 7.

On prépare des compositions vaccinales comprenant les éléments suivants:

- antigènes sous-unitaires contre le RSV (ou Virus Syncytial Respiratoire) en présence de gel d'aluminium, à raison de 1 µgramme de protéines totales (Protéines F, G et M)
- solution 3Db(S) obtenue à l'exemple 1,
- émulsion 3 Db(S) obtenue à l'exemple 4,
- émulsion MGC(S) obtenue à l'exemple 4.

Les doses sont de 50µl/litres et comprennent 50 microgrammes d'oligonucléotides.

Ces compositions sont administrées à des souris à J0 et à J28; 5 à 6 semaines après l'injection de rappel, on prélève les rates des souris afin d'évaluer la quantité d'interféron γ produite.

On obtient les résultats suivants, après dosage ELISA effectué après restimulation secondaire in vitro:

	Quantité d' Interféron en pg/ml
Antigènes + Adjuvant aluminium	3432
	2565
	2898
Antigènes + Adjuvant aluminium + 3 Db(S)	13400
	8543
	1147
Antigènes + Adjuvant aluminium + émulsion MGC(S)	5130
	9216
	7173
Antigènes + Adjuvant aluminium + émulsion selon l'invention	57394
	42285
	49839

Ces résultats montrent clairement la synergie obtenue en utilisant un oligonucléotide immunostimulant et une émulsion selon l'invention ; lorsqu'on s'intéresse au RSV et qu'on observe la production d'interféron γ qui est un bon indicateur de la réponse TH1.

Exemple 8:

On prépare des doses d'immunisation identiques à celles de l'exemple 7, à l'exception des antigènes RSV qui ne sont pas en présence de gel d'aluminium. Les doses de 50µl/litres sont administrées en intramusculaire à des groupes de 8 souris.

4 semaines après l'immunisation, les souris sont saignées et les taux d'anticorps anti-protéines F sont déterminés par titrage ELISA. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant :

	Ig G	Ig G1	Ig G2a
Antigènes + PBS	100	100	100
	100	100	100
	100	100	100
	100	100	100
Antigènes + 3D(S)	6400	400	6400
	6400	400	12800
	12800	800	6400
	6400	400	3200
	3200	100	25600
	6400	400	25600
Antigènes + émulsion MGC(S)	12800	1600	6400
	6400	400	100
	51200	6400	100
	25600	1600	100
	25600	1600	100
Antigènes + émulsion selon l'invention	25600	1600	25600
	12800	400	12800
	51200	1600	25600
	102400	6400	1600
	51200	3200	25600

Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser une émulsion selon l'invention dans le cas où les antigènes sont les antigènes du Virus Syncytial Respiratoire.

# REVENDICATIONS

1. Emulsion immunostimulante du type huile dans eau, comprenant au moins une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un polynucéotide immunostimulant dont au moins une partie est coupée de façon covalente à au moins une molécule lipidique.
2. Emulsion selon la revendication 1, caractérisée en ce que la molécule lipidique est une molécule de cholestérol.
3. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucéotide immunostimulant comprend au moins une séquence palindromique.
4. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucéotide immunostimulant est un oligodésoxynucéotide phosphodiester, phosphorothioate ou un hybride phosphodiester phosphorothioate.
5. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucéotide immunostimulant comprend une séquence GAGAACGGCTCGACCTTGAT.
6. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la partie coupée à au moins une molécule lipidique est située à l'extrémité 5' du polynucéotide.
7. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la molécule lipidique est une molécule de cholestérol.
8. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, au moins un surfactant.
9. Emulsion selon la revendication 8, caractérisée en ce que le surfactant est du Tween 80.



10. Emulsion selon une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend du squalène

11. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une émulsion immunostimulante selon une des revendications 1 à 10.

12. Composition vaccinale selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène vaccinal contre la grippe

13. Composition vaccinale selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène vaccinal du Virus Syncytial Respiratoire.

14. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à stimuler le système immunitaire.

15. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à produire une réponse de type TH1.

16. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la sécrétion d'interféron.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (11) DEPOSANT:

(A) NOM: Pasteur Merieux Serums & Vaccins  
(B) RUE: 58 avenue Laclerc  
(C) VILLE: Lyon  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 69607  
(G) TELEPHONE: 33 (0) 4 72 73 70 90  
(H) TELECOPIER: 33 (0) 4 72 73 78 50

## (12) TITRE DE L'INVENTION: Emulsion immunostimulante

## (13) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

## (14) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: Patentin Release \$1.0, Version \$1.30 (025)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucl,otide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: lin,aire

## (11) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (12) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAGAGAGCTC GAGCTTCGAT

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucl,otide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: lin,aire

## (11) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (12) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGGGTCAGAGC TTGAGGGGGG

20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**